

食品機能进行评估のための F I A

受田 浩之

高知大学農学部：〒783-8502 南国市物部乙200

1. はじめに

図1のマークをご存知の読者も多いと思う。これは厚生労働省が認可した特定保健用食品（通称トクホ）のマークである。特定保健用食品とは、健康の維持増進に役立ち、特定の保健の用途に資することを目的に開発され、厚生労働省の承認を得た食品である。これまでに300種類以上の商品がトクホ承認されている。2001年の売上は推定で4,154億円、国民医療費の削減が叫ばれる中、今後もその市場は飛躍的に拡大していくことが期待されている。



図1 トクホマーク

トクホの商品開発には、1) 特定の保健効果を反映するアッセイ法を利用して、食品素材の生体調節機能をスクリーニングすること、2) その機能に関与する成分を特定し、構造を明らかにすること、3) その関与成分の安全性を評価すること、さらに4) ヒトに対する実際の効果を明らかにすること、などのステップが必要となる。このうち、3の安全性試験や4のヒト試験に移せるパイプラインを充実させるためには、1のスクリーニン

グをいかに迅速化、自動化できるかがポイントになる。F I A法はこのスクリーニング技術として、理想的な方法の一つである。

本解説では、これまでにトクホ開発を目指して考案された食品の生体調節機能評価用の固定化酵素—F I Aシステムについて説明する。

2. 高血圧予防食品開発のための F I A

高血圧予防食品の開発分野では、レニン—アンジオテンシン昇圧系をブロックするため、アンジオテンシンI変換酵素（ACE）の阻害活性を示す食品成分の検索が活発に行われている¹⁾。一般のACE阻害活性評価(*in vitro*系)では、擬似基質としてヒプリル—ヒスチジル—ロイシン(HHL)が用いられており、ACEの作用によって生じる馬尿酸を吸光度で検出する。これに対してMatsumotoらは、まずバッチ系にてACEとHHLを37℃にて60分反応させた後、沸騰湯浴中で5分間加熱して反応を停止させ、図2に示すF I Aシステムに導入した^{2, 3)}。ACEの活性に依存して生成する馬尿酸はストップフローでアミノアシラーゼを固定化したカラムに35秒間滞留させ、安息香酸へと変えられる。生じた安息香酸は下流に設置した固定化D-アミノ酸オキシダーゼカラムに運ばれると、D-アラニンの酸化を阻害し、結果的に反応で生成する過酸化水素濃度を低下させる。キャリアー溶液に連続的にD-アラニンを送液し、固体電極を用いて過酸化水素をアンペロメトリックにモニタリングすると、安息香酸濃度が高くなるにつれて大きなネガティブピークが観察されることになる。結果的にACEの活性が高いほど、大きなピークが出現する。この

システムを用いて実際に降圧剤のカプトプリルや、「血圧が高めの方に適した食品」としてトクホ認可を受けているイワシペプチドの Val-Tyr の ACE 阻害活性を評価できることが確認されている。1 検体の分析時間は約 8 分であり、従来の方法を各段に迅速化できることから、今後本システムは未知試料の ACE 阻害活性評価法として利用できるものと考えられる。

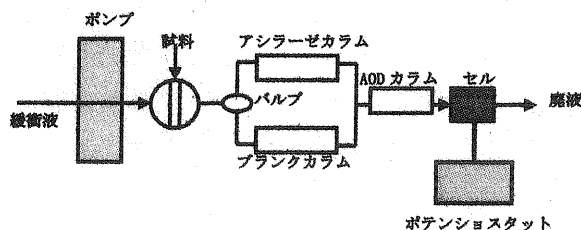


図2 ACE 阻害活性測定のための FIA²⁾

緩衝液として 0.4 mM D-アラニンを含むリン酸塩緩衝液(pH 8.3)を使用する。AOD カラムは D-アミノ酸オキシダーゼリアクター。

3. 糖尿病予防食品開発のための F I A

糖尿病は予備軍も合わせると日本人の約 1 割 (1,370 万人) が罹患していると言われるが、血糖値を適切に維持することにより、その治療及び合併症の予防が可能である。一般に、食品成分である糖質 (多糖類) はアミラーゼの作用によってマルトース単位まで消化された後 (スクロースの場合はそのままの状態)、小腸上皮に到達する。その後、上皮膜細胞に存在する α -グルコシダーゼ (AGH) の作用によってグルコースまで分解され、門脈を介して肝臓に蓄積される。このため糖尿病予防として、食後の血糖値上昇を遅延し得る、すなわち二糖類からグルコースの生成を触媒する AGH に対して阻害活性を有する成分を食品に求める研究が行われつつある⁴⁾。AGH 阻害測定法として *in vitro* で行われている簡便法は、合成基質として *p*-ニトロフェニル- α -D-グルコシドを用いて、酵母由来 AGH の作用によって生じる *p*-ニトロフェノールの吸光度 (405 nm) から AGH 阻害活性を求める方法である。Matsumoto らは直接マルトース及びスクロースを基質とし、

ラット小腸由来 AGH を担体に固定化し、小腸上皮細胞の環境を模した *pseudo-in vivo* 測定を設定した⁵⁾。6 つの並列に設置した AGH 固定化リアクターからなる F I A システムを図 3 に示す。基質であるマルトースと混合した試料をライン中に注入し、これが AGH 固定化リアクターに到達したとき、キャリアーの流れを停止する。30 分後、フローを再開させると、反応で生成したグルコースが下流に設置したグルコースオキシダーゼとムタロターゼを同時に固定化したリアクターに送液され、消費された酸素がクラーク型酸素電極で検出される。阻害活性の強い試料ほど、遊離のグルコース濃度が低下することから、消費される酸素量が少なくなる。さらに本システムでは AGH リアクターを 6 連にして、バルブスイッチングを巧みにタイマー制御することで、1 時間当たり 5 検体以上の分析が可能である。本システムは市販の AGH 阻害薬に適用が可能であることから、迅速で、かつ *in vivo* 系に近い評価結果を得られる方法として、今後 AGH 阻害食品のスクリーニング法として幅広い利用が期待される。

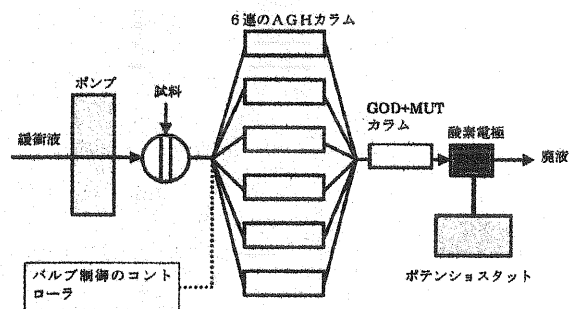


図3 AGH 阻害活性測定のための FIA (マルチチャンネルストップフロー) システム⁵⁾

GOD+MUT カラム: グルコースオキシダーゼとムタロターゼを同時に固定化したリアクター

4. 抗酸化食品開発のための F I A

酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) はスーパーオキシドアニオン (O_2^-) を過酸化水素と酸素に不均化する酵素である。本酵素は酸化ストレスに対する防御の上で重要な役割を果たしている。生物の有する SOD 活性と寿命との間の

有意な相関, 生活習慣病や種々の疾病との関わりも示され, その活性がライフサイエンスの様々な分野において重要な知見を与えることが明らかにされている. そこで, SODと同様に O_2^- を不均化する活性 (SOD様活性) や O_2^- の消去活性を有する成分を食品から摂取することで, 老化や生活習慣病を予防しようとするアプローチが試みられている⁶⁾. このような広い意味での抗酸化食品の開発には, 食品試料の有するSOD様活性を簡易・迅速に測定する技術が必要とされる.

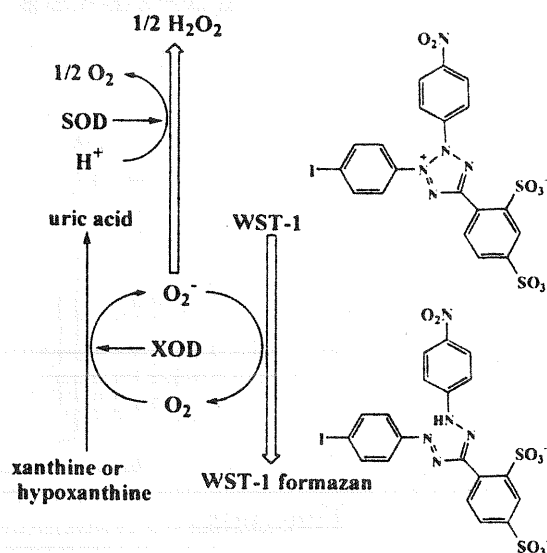


図4 水溶性テトラゾリウム塩 WST-1 を用いた SOD 活性測定法の原理

SODの活性測定法としては酵素キサンチンオキシダーゼ (XO) によるヒポキサンチンの酸化反応で生成させた O_2^- の捕捉能力をテトラゾリウム塩と競合させて測定する方法が一般的に利用されている (図4). しかしながら汎用されているニトロブルーテトラゾリウム (NBT) は O_2^- により還元されると水不溶性となり取り扱い難いこと, さらに過剰量のSODをアッセイ系に添加しても 100%阻害が認められないことなどの欠点を有している. これに対して最近開発された水溶性テトラゾリウム塩 (XTT, WST-1, WST-8) では, 過剰量の添加により 100%阻害が認められることから, SOD活性測定に適した捕捉剤であることが明らかにされた (図5)⁷⁾.

8). このうちWST-1を捕捉剤とするアッセイ法は, すでに各種嗜好飲料の O_2^- 消去活性の測定に適用可能であることが示されている⁹⁾.

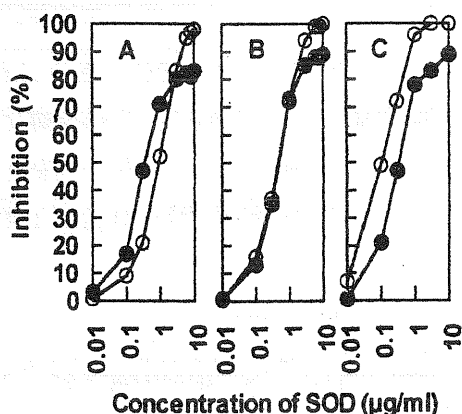


図5 種々の pH (A, pH 8.0; ; B, pH 9.4 ; C, pH 10.2) で得られる SOD の阻害曲線⁷⁾

●が NBT, ○が XTT の結果を示す. WST-1 及び WST-8 においても同様に 100%の阻害が観測される.

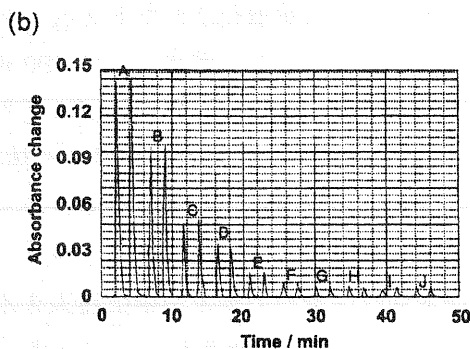
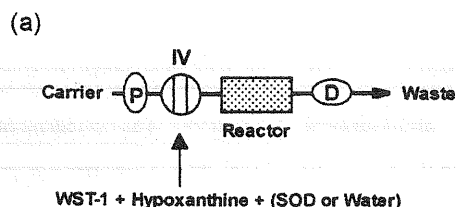


図6 SOD 活性の FIA システム¹⁰⁾

(a) FIA システム. P, ポンプ; IV, インジェクションバルブ; D, 検出器. (b) SOD 標品の応答曲線. SOD 濃度 ($\mu\text{g/ml}$): A, 0; B, 1; C, 2.5; D, 5; E, 10; F, 25; G, 50; H, 100; I, 250; J, 500.

水溶性テトラゾリウム塩に基づく SOD 活性測定は容易に FIA に展開できる¹⁰⁾. この場合,

O_2^- の発生に必要なXOを担体に固定化し、リアクターとして用いることで、迅速性の向上と共に経済性の付与も図れる。試料を予めWST-1及びヒポキサンチン溶液と混合した上でXO固定化リアクターに注入すると、SOD活性がない場合に最大のピーク高が見られ、活性の強さに依存してピーク高が減少する(図6)。この原理に基づき1時間当たり30検体以上の分析が可能となり、従来のバッチ法の分析時間を10倍以上短縮できる。

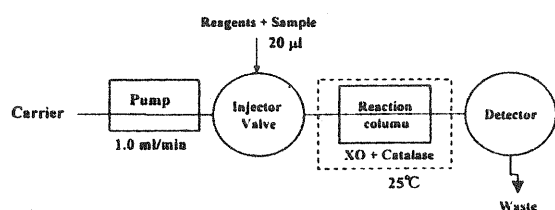


図7 CL-FIA システム¹¹⁾

Carrier, 100 mM ピロリン酸塩緩衝液(pH 9.0); Reagents, 250 μ M ヒポキサンチン+1 mM ルシゲニン; XO, キサンチンオキシダーゼ; Detector, 化学発光検出器

吸光光度法による O_2^- 消去活性測定法をさらに高感度化、高迅速化する目的で、 O_2^- の捕捉剤として化学発光プローブ・ルシゲニンをを用いた化学発光-FIA (CL-FIA) 法の開発が行われている¹¹⁾。現在までに最適化されたFIAシステムを図7に示す。キャリアー溶液として100 mM ピロリン酸塩緩衝液 (pH 9.0) をポンプにより流量1.0 ml/minで送液する。希釈した試料9体積を1 mM ルシゲニンと250 μ M ヒポキサンチンからなる試薬溶液1体積と予め混合して、その20 μ lをオートサンプラーでライン中に注入する。試料はXOを固定化した酵素リアクター内へ運ばれる。ここでヒポキサンチンの尿酸への酸化に伴い発生する O_2^- に対してルシゲニンと試料中の O_2^- 消去物質の間で競合反応が起こる。試料の代わりに水を注入した際に観察される発光のピーク高を H_0 、また試料で観察される発光のピーク高を H_1 とすると、試料中の O_2^- 消去活性が強くなるにつれて H_1 は小さくなる。試料の阻害率I

(%)は次式で求められる。

$$I = 100 \times (H_0 - H_1) / H_0$$

50%阻害を与える試料の希釈倍率を正確に求め、その希釈倍率における試料溶液が IC_{50} 値を示すSOD標品と等価であると考えて、試料原液、または試料固体重量当たりの O_2^- 消去活性を算出する。

本法はこれまでに開発されたSOD活性測定法の中で最も迅速な分析法である。SODに対する実際の応答曲線を図8に示す。流量1.0 ml/minの条件では、1時間当たり60検体の分析が可能である。

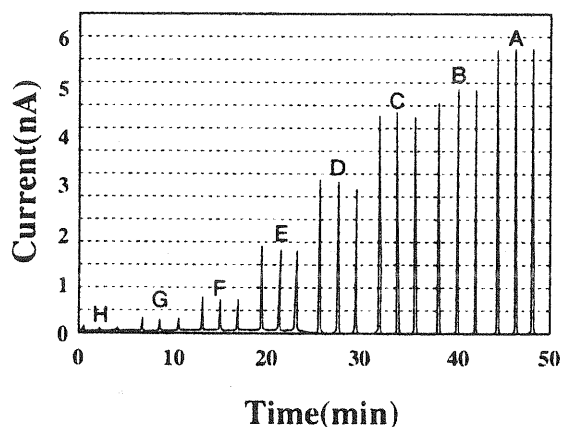


図8 SODに対するCL-FIAシステムの応答曲線¹¹⁾

A, 0; B, 25; C, 50; D, 100; E, 250; F, 500; G, 1000; H, 2000 ng/ml.

本システムはすでに新規機能性素材の検索に利用されている。森山らは高知県で生産される農産物について、それらの示す O_2^- 消去活性を評価している¹²⁾。用いられた試料は高知県内で栽培・市販されているギャバロン茶、碁石茶、桑茶、シトウ、インゲン豆、紫峰栗、オクラ、デラウェア、キュウリ、ミニトマト、乾燥アロエ、ビワ、スモモである。これらの水抽出液について、本CL-FIAで得られた活性を従来法である電子スピン共鳴 (ESR) 法と比較したところ、両者の間には相関係数0.997の高い直線的相関が認められた。本結果は本法が様々な食品素材のスクリ

ーニング法として利用可能であることを明示する。さらに得られた活性を見ると、碁石茶やギャバロン茶が従来まで報告されている緑茶の活性と同等、またはそれ以上であることが判明し、トクホ素材として有望な地域資源であることが明らかとなった。この成果を基に新しい商品開発まで結び付けていく取り組みが継続中である。

5. おわりに

食品機能の評価を目的に開発されたF I A法について紹介した。これらの方法はすべて検出や基質の生成に固定化酵素を利用したものである。他の原理に基づいた食品機能評価システムについては、また改めて紹介させていただきたい。

上述のように、実用的に利用された方法はまだまだ少なく、F I Aがトクホの商品開発に貢献するには、さらに多くの研究者の叡智が必要である。最初にも述べたようにトクホ市場は今後さらに成長していくことが期待されている。2010年にはその市場規模は一兆円を超えるとの予想もあるが、F I Aの導入が進み、スクリーニング技術が迅速化されれば、さらにその成長に拍車が掛かるものと期待される。日本経済再生の切り札的存在であるトクホの成長にF I A研究者のお力をお借りしたい。

参考文献

- 1) Y.-H. Chen., Y.-H. Liu, Y.-H. Yang, H.-H. Feng, C.-T. Chang and C.-C. Chen, *Food Sci. Technol. Res.*, **8**, 144 (2002).
- 2) K.J.M. Abesundara, M. Higuchi and K. Matsumoto, *Anal. Sci.*, **17**(suppl), i1411 (2001).
- 3) K.J.M. Abesundara, M. Higuchi, T. Matsui and K. Matsumoto, *Anal. Sci.*, **18**, 467 (2002).
- 4) T. Matsui, S. Ebuchi, M. Kobayashi, K. Fukui, K. Sugita, N. Terahara and K. Matsumoto, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7244 (2002).
- 5) K. Matsumoto, K. Takayama, K.J.M. Abesundara, *Anal. Chim. Acta*, **479**, 135 (2002).
- 6) 受田浩之, *Dojin News*, **96**, 1 (2000).
- 7) H. Ukeda, S. Maeda, T. Ishii and M. Sawamura, *Anal. Biochem.*, **251**, 206 (1997).
- 8) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 485 (1999).
- 9) 受田浩之, 森山洋憲, 川名大介, 片山泰幸, 中林錦一, 沢村正義, *食科工*, **49**, 25 (2002).
- 10) H. Ukeda, A.K. Sarker, D. Kawana and M. Sawamura, *Anal. Sci.*, **15**, 353 (1999).
- 11) H. Ukeda, A.K. Sarker, D. Kawana and M. Sawamura, *Anal. Chim. Acta*, **468**, 137 (2001).
- 12) 森山洋憲, 片山泰幸, 中林錦一, 受田浩之, 沢村正義, *食科工*, **49**, 679 (2002).

(Received March 27, 2003)

